



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 202 645**

⑤① Int. Cl.7: **C07D 403/06**  
**A61K 31/55**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud: **97946494 .8**

⑧⑥ Fecha de presentación: **04.11.1997**

⑧⑦ Número de presentación de la solicitud: **0937067**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.1999**

⑤④ Título: **Ureas 1-(3-aminoindazol-5-il)-3-fenilmetil-cíclicas útiles como inhibidores de proteasa del HIV.**

③⑩ Prioridad: **08.11.1996 US 747104**  
**08.11.1996 US 29745 P**

⑦③ Titular/es: **Bristol-Myers Squibb Pharma Company**  
**Lawrenceville-Princeton Road, P.O. Box 4000**  
**Princeton, New Jersey 08543, US**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2004**

⑦② Inventor/es: **Rodgers, James David y**  
**Kaltenbach, Robert Frank III**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2004**

⑦④ Agente: **Manresa Val, Manuel**

**ES 2 202 645 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Ureas 1-(3-aminoindazol-5-il)-3-fenilmetil-cíclicas útiles como inhibidores de proteasa del HIV.

5 Esta invención se refiere en general a ureas 1-(3-aminoindazol-5-il)-3-fenilmetil-cíclicas que son útiles como inhibidores de proteasa del HIV, a composiciones farmacéuticas y a conjuntos de materiales y utensilios para diagnosis que las comprenden, y al uso de las mismas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por HIV.

10 Dos retrovirus distintos, que son el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) del tipo 1 (HIV-1) o del tipo 2 (HIV-2), han sido etiológicamente vinculados a la enfermedad inmunosupresiva llamada síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los individuos seropositivos para el HIV son inicialmente asintomáticos pero desarrollan típicamente el complejo relacionado con el SIDA, seguido por el SIDA. Los individuos afectados presentan inmunosupresión severa que les predispone a contraer infecciones oportunistas debilitantes y finalmente fatales.

15 La enfermedad del SIDA es el resultado final de la evolución que se produce cuando un virus HIV-1 o HIV-2 sigue su propio ciclo vital complejo. El ciclo vital del virión comienza al unirse el virión a la célula inmunológica consistente en el linfocito T-4 humano huésped por medio de la fijación de una glicoproteína de la superficie de la envoltura protectora del virión a la glicoproteína CD4 del linfocito. Una vez unido, el virión se desprende de su envoltura glicoproteica, penetra en la membrana de la célula huésped, y descubre su RNA. La enzima del virión, es decir la transcriptasa inversa, dirige el proceso de transcribir el RNA a DNA de una sola hebra. El RNA viral es degradado y es creada una segunda hebra de DNA. El DNA ahora de doble hebra es integrado en los genes de la célula humana, y esos genes son usados para la reproducción celular.

25 En este punto, la célula humana lleva a cabo su proceso reproductivo usando su propia RNA polimerasa para transcribir el DNA integrado a RNA viral. El RNA viral es traducido a la poliproteína de fusión *gal-pol* precursora. La poliproteína es entonces segmentada por la enzima proteasa del HIV para producir las proteínas virales maduras. Así, la proteasa del HIV es responsable de regular una cascada de eventos de segmentación que dan lugar a que la partícula virósica madure convirtiéndose en un virus que es capaz de presentar plena infectividad.

30 La típica respuesta del sistema inmunológico humano, consistente en matar al virión invasor, es puesta a prueba porque una gran parte del ciclo vital del virión transcurre en un estado latente dentro de la célula inmunológica. Además, la transcriptasa inversa viral, que es la enzima que es usada para hacer una nueva partícula virósica elemental, no es muy específica y ocasiona errores de transcripción que redundan en glicoproteínas continuamente variables en la superficie de la envoltura protectora virósica. Esta falta de especificidad hace que disminuya la eficacia del sistema inmunológico porque los anticuerpos que son producidos específicamente contra una glicoproteína pueden ser inútiles contra otra, con lo cual se ve reducido el número de anticuerpos que están disponibles para combatir el virus. El virus sigue reproduciéndose mientras el sistema de respuesta inmune sigue debilitándose. Finalmente, el HIV domina en gran medida el sistema inmunológico del cuerpo, permitiendo que se establezcan infecciones oportunistas, y sin una administración de agentes antivirales, inmunomoduladores o ambos, puede producirse como resultado final la muerte.

40 Hay al menos tres puntos decisivos en el ciclo vital del virus que han sido identificados como posibles objetivos para las drogas antivirales: (1) la unión inicial del virión al sitio del linfocito T-4 o macrófago, (2) la transcripción del RNA virósico a DNA virósico (transcriptasa inversa, RT), y (3) el ensamblaje de la nueva partícula virósica durante la reproducción (p. ej. ácido aspártico proteasa del HIV o proteasa del HIV).

50 Los genomas de los retrovirus codifican una proteasa que es responsable de la elaboración proteolítica de uno o varios precursores de poliproteína tales como los productos génicos *pol* y *gag*. Véase Wellink, *Arch. Virol.* 98 1 (1988). Las proteasas retrovirales transforman muy comúnmente el precursor *gag* en las proteínas nucleares, y transforman también el precursor *pol* en transcriptasa inversa y proteasa retroviral.

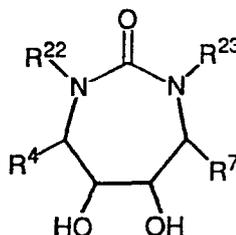
55 La correcta transformación de las poliproteínas precursoras por parte de la proteasa retroviral es necesaria para el ensamblaje de los viriones infecciosos. Se ha demostrado que la mutagénesis *in vitro* que produce virus proteasa-defectivos conduce a la producción de formas nucleares inmaduras a las que falta infectividad. Véase Crawford et al., *J. Virol.* 53 899 (1985); Katoh et al., *Virology* 145 280 (1985). Por consiguiente, la inhibición de la proteasa retroviral constituye un atractivo objetivo para la terapia antiviral. Véase Mitsuya, *Nature* 325 775 (1987).

60 La capacidad de inhibir una proteasa viral proporciona un método para bloquear la replicación viral y por consiguiente un tratamiento para enfermedades virósicas, tales como el SIDA, que puede tener menos efectos secundarios, puede ser más eficaz y puede ser menos susceptible de sufrir resistencia a las drogas en comparación con los tratamientos actuales. Como resultado de ello, están siendo actualmente comercializados tres inhibidores de proteasa del HIV, que son el saquinavir de Roche, el ritonavir de Abbott y el indinavir de Merck, y están en pruebas clínicas los de una serie de potenciales inhibidores de proteasa, como p. ej. el VX-478 de Vertex, el nelfinavir de Agouron, el KNI-272 de Japan Energy y el CGP 61755 de Ciba-Geigy.

65 Como queda evidenciado por los inhibidores de proteasa que están siendo actualmente comercializados y usados en pruebas clínicas, han sido estudiados como potenciales inhibidores de proteasa del HIV los de una extensa variedad de compuestos. Han sido objeto de considerable atención las ureas cíclicas mononucleares. Por ejemplo, en la Soli-

## ES 2 202 645 T3

ciudad Número WO94/19329 al amparo del PCT (PCT = Tratado de Cooperación en Materia de Patentes), Lam et al. describen genéricamente ureas cíclicas de la fórmula:



15 y métodos para preparar estas ureas. A pesar de que los presentes compuestos quedan dentro de la descripción de Lam et al., los mismos no están descritos específicamente en dicha publicación.

La US 5.532.357, de Rodgers et al., se refiere a métodos para la preparación de ureas cíclicas asimétricamente sustituidas que son útiles como inhibidores de proteasa del HIV.

20 Incluso con el actual éxito de los inhibidores de proteasa, se ha comprobado que los pacientes con HIV pueden devenir resistentes a un inhibidor de proteasa individual. Es por consiguiente deseable desarrollar adicionales inhibidores de proteasa para combatir adicionalmente la infección por HIV.

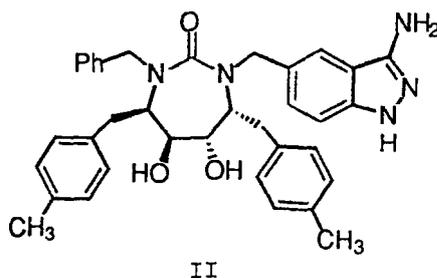
25 En consecuencia, un objetivo de la presente invención es el de aportar nuevos inhibidores de proteasa.

Es otro objetivo de la presente invención aportar composiciones farmacéuticas con actividad de inhibición de proteasa que comprendan un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos de la presente invención o una sal o forma de prodroga farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Es otro objetivo de la presente invención aportar un nuevo uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para tratar la infección por HIV.

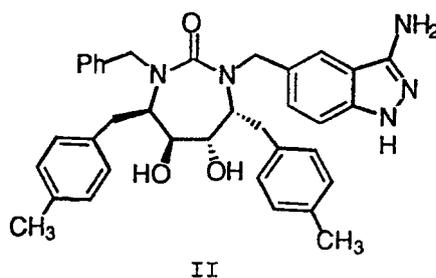
35 Es otro objetivo de la presente invención el de aportar una combinación terapéuticamente eficaz de (a) uno de los compuestos de la presente invención y (b) uno o varios compuestos seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de inhibidores de transcriptasa inversa del HIV e inhibidores de proteasa del HIV para su uso en el tratamiento de la infección por HIV.

40 Estos y otros objetivos que quedarán de manifiesto a lo largo de la siguiente descripción detallada han sido alcanzados mediante el descubrimiento de los inventores de que los compuestos de fórmula II:



definida a continuación son eficaces inhibidores de proteasa.

55 Así, en una primera realización, la presente invención aporta un nuevo compuesto de fórmula II:



## ES 2 202 645 T3

en la que cada R es OH o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

o un compuesto de fórmula II en la que ambos grupos R tomados juntamente forman una mitad seleccionada de entre los miembros del grupo que consta de -O-, -OCH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>O-, -OC(=O)O-, -OCH<sub>2</sub>O-, -OC(=S)O-, -OC(=O)C(=O)O-, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O-, -OC((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)(CH<sub>3</sub>)O-, -OC(OCH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)O- u -OS(=O)O-.

En una segunda realización, la presente invención aporta una nueva composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención.

En una tercera realización, la presente invención aporta un compuesto de fórmula II destinado a ser usado para tratar la infección por HIV.

En una cuarta realización, la presente invención aporta un nuevo uso de un compuesto de la presente invención en la fabricación de un medicamento destinado a ser usado para tratar la infección por HIV.

En una quinta realización, la presente invención aporta una nueva combinación de:

(a) un compuesto de la presente invención; y

(b) al menos un compuesto seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de inhibidores de transcriptasa inversa del HIV e inhibidores de proteasa del HIV destinados a ser usados para tratar la infección por HIV.

En otra realización preferida, el inhibidor de transcriptasa inversa es un inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa.

En otra realización más preferida, el inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de AZT, 3TC, ddI, ddC y d4T, y el inhibidor de proteasa es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de saquinavir, ritonavir, indinavir, VX-478, nelfinavir, KNI-272, CGP-61755 y U-103017.

En una realización aún más preferida, el inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de AZT y 3TC, y el inhibidor de proteasa es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de saquinavir, ritonavir e indinavir.

En una realización aún más preferida, el inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa es AZT.

En otra realización aún más preferida, el inhibidor de proteasa es indinavir.

En una sexta realización, la presente invención aporta un conjunto farmacéutico de materiales y utensilios que es útil para el tratamiento de la infección por HIV y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de:

(a) un compuesto de la invención; y

(b) al menos un compuesto seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de inhibidores de transcriptasa inversa del HIV e inhibidores de proteasa del HIV, en uno o varios envases estériles.

En otra realización preferida, el compuesto es de fórmula I.

En el sentido en el que se les utiliza en la presente, los siguientes vocablos y expresiones tienen los significados que se indican a continuación. Se comprenderá que los compuestos de la presente invención contienen un átomo de carbono asimétricamente sustituido y pueden ser aislados en formas ópticamente activas o racémicas. Es perfectamente sabido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas, tal como mediante resolución de formas racémicas o mediante síntesis, a partir de materiales de partida ópticamente activos. Se incluyen todas las formas quirales, diastoméricas y racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a no ser que se indique específicamente la estereoquímica o forma isomérica específica.

En el sentido en que se la usa en la presente, la expresión "inhibidor de transcriptasa inversa del HIV" se refiere a los inhibidores tanto nucleósidos como no nucleósidos de la transcriptasa inversa (RT) del HIV. Los ejemplos de inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa incluyen el AZT, ddC, ddI, d4T y 3TC, aunque no quedan limitados a los mismos. Los ejemplos de inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa incluyen el vivradine (Pharmacia y Upjohn U90152S), derivados de TIBO, BI-RG-587, nevirapine, L-697, 661, LY 73497 y Ro 18,893 (Roche), aunque no quedan limitados a los mismos.

En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión "inhibidor de proteasa del HIV" se refiere a compuestos que inhiben la proteasa del HIV. Los ejemplos incluyen el saquinavir (Roche, Ro31-8959), ritonavir (Abbott, ABT-538), indinavir (Merck, MK-639), VX-478 (Vertex/Glaxo Wellcome), nelfinavir (Agouron, AG-1343), KNI-272 (Japan Energy), CGP-61755 (Ciba-Geigy) y U-103017 (Pharmacia and Upjohn), aunque no quedan limitados

## ES 2 202 645 T3

a los mismos. Los ejemplos adicionales incluyen los inhibidores cíclicos de la proteasa que están descritos en la WO93/07128, en la WO94/19329, en la WO94/22840 y en la Solicitud N° US96/03426 presentada al amparo del PCT.

5 En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto progenitor es modificado haciendo sales ácidas o básicas del mismo. Sin quedar limitados a las mismas, los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos tales como aminas, las sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos, y sales similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales atóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto progenitor formadas, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos atóxicos. Por ejemplo, tales sales atóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico y nítrico y ácidos similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como los ácidos acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pámico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico e isetiónico y ácidos similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden ser sintetizadas a partir del compuesto progenitor que contiene una mitad básica o ácida por métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden ser preparadas haciendo que las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos reaccionen con una cantidad estequiométrica de la base apropiada o del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos; siendo en general preferidos medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Se encuentran listas de sales adecuadas en la publicación titulada *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed., de la Mack Publishing Company, de Easton, PA, 1985, p. 1418, cuya descripción queda incorporada a la presente por referencia.

La frase “farmacéuticamente aceptables” es empleada en la presente para hacer referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del marco del recto juicio médico, son adecuados para ser usados en contacto con los tejidos de los seres humanos y los animales sin excesiva toxicidad, irritación o respuesta alérgica y sin otros problemas o complicaciones de acuerdo con una razonable relación entre ventajas/riesgos.

Las “prodrogas” son vehículos que liberan la droga progenitora activa según la fórmula II *in vivo* cuando tal prodroga es administrada a un sujeto mamífero. Las prodrogas de un compuesto de la presente invención son preparadas a base de modificar los grupos funcionales que están presentes en el compuesto de forma tal que las modificaciones sean divididas, ya sea en la manipulación rutinaria o bien *in vivo*, para ser convertidas en el compuesto progenitor. Las prodrogas de la invención son compuestos en los que los dos grupos R de la fórmula II se unen para formar un epóxido;  $-\text{OCH}_2\text{SCH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(=\text{S})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$ ,  $-\text{OC}((\text{CH}_2)_3\text{NH}_2)(\text{CH}_3)\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{O}-$  u  $-\text{OS}(=\text{O})\text{O}-$ .

Con las expresiones “compuesto estable” y “estructura estable” se pretende indicar un compuesto que es lo suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado de pureza útil a partir de una mezcla de reacción y a la formulación para su conversión en un agente terapéutico eficaz. La presente invención contempla solamente compuestos estables.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” es utilizada en la presente para designar una cantidad de un compuesto de la presente invención o una cantidad de la combinación de compuestos de la que se afirma que es eficaz para inhibir la infección por HIV o para tratar los síntomas de la infección por HIV en un huésped. La combinación de compuestos es preferiblemente una combinación sinérgica. Según la describen, por ejemplo, Chou y Talalay, en *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55 (1984), se produce sinergia cuando el efecto (en este caso la inhibición de la replicación del HIV) de los compuestos al ser administrados en combinación es mayor que el efecto aditivo de los compuestos al ser administrados en solitario como agentes individuales. Un efecto sinérgico queda en general demostrado con la máxima claridad a concentraciones subóptimas de los compuestos. La sinergia puede darse en forma de una menor citotoxicidad, de un incrementado efecto antiviral o de algún otro efecto beneficioso de la combinación en comparación con los componentes individuales.

Otras características de la invención quedarán de manifiesto a lo largo de las siguientes descripciones de realizaciones ejemplificativas que se dan para ilustrar la invención y no pretenden constituir limitaciones de la misma.

### Ejemplos

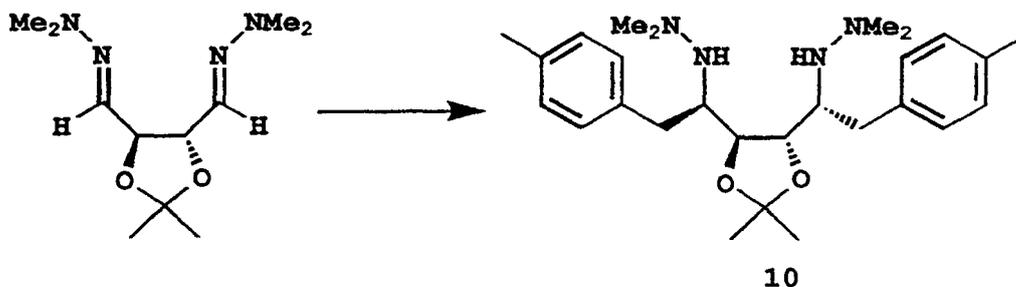
Se definen a continuación las abreviaturas utilizadas en los Ejemplos: “°C” significa grados Celsius; “d” significa doblete; “dd” significa doblete de dobletes; “eq” significa equivalente o equivalentes; “g” significa gramo o gramos; “mg” significa miligramo o miligramos; “ml” significa mililitro o mililitros; “H” significa hidrógeno o hidrógenos; “h” significa hora u horas; “m” significa multiplete; “M” significa molar; “min” significa minuto o minutos; “MHz” significa megahertzios; “MS” significa espectroscopia de masas; “nmr” o “NMR” significa espectroscopia de resonancia magnética nuclear; “t” significa triplete; y “TLC” significa cromatografía en capa fina.

## Ejemplo 1

Preparación de (4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-hexahidro-1-[5-(3-aminoindazol) metil]-5,6-dihidroxi-4,7-bis[(4-metilfenil) metil]-3-fenilmetil-2*H*-1,3-diazapin-2-ona (II)

## Parte A

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-2,5-bis(2,2-dimetilhidrazo)-1,6-bis(4-metilfenil)-3,4-*O*-isopropilidenoheptanodiol (10)

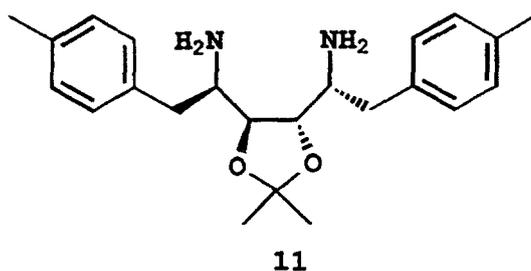


La hidrazona de partida puede ser preparada por el método de Rossano et al. (véase la Fórmula 3a en la página 4968 de *Tetr. Lett.* **1995**, 36(28), 4967-70).

A *p*-xileno (57 ml, 464 mmoles) a 15°C le fue añadido gota a gota por espacio de 5 min. *sec*-butillitio (95 ml, 123 mmoles, 1,3M en ciclohexano). La solución fue enfriada hasta -15°C, y fue añadido gota a gota THF (THF = tetrahidrofurano) (30 ml). Tras agitación durante 1 h, fue añadida gota a gota la hidrazona (10,2 g, 42 mmoles) en THF (30 ml). La mezcla de reacción fue agitada durante 20 min. y fue calentada hasta 0°C. La solución fue extinguida cuidadosamente con agua y fue sometida a extracción con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas fueron extraídas con HCl 1N y las fracciones acuosas combinadas fueron hechas fuertemente básicas con NaOH acuoso al 50%. La mezcla resultante fue sometida a extracción con EtOAc, lavada con salmuera y secada (MgSO<sub>4</sub>). El disolvente fue retirado bajo presión reducida, habiendo sido así obtenida la bis-hidrazina **10** en forma de un aceite (19,25 g, 99%): RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.08 (s, 8 H), 4.09 (s, 2 H), 3.02 (t, J = 7.1 Hz, 2 H), 2.67 (m, 4 H), 2.31 (s, 6 H), 2.17 (s, 12 H), 1.43 (s, 6 H); IR (KBr) ν 2980, 2940, 1680, 1510, 1240 cm<sup>-1</sup>; LRMS (ESI) m/z: 455 (M+ H<sup>+</sup>, 6%), 228 (M+2H<sup>+</sup>, 100%); HRMS calcd. para C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 455.3386; hallado 455.3393.

## Parte B

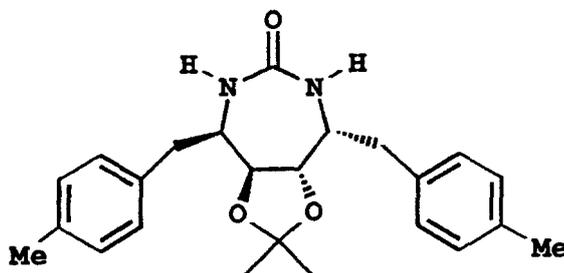
(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-2,5-diamino-1,6-bis(4-metilfenil)-3,4-*O*-isopropilidenoheptanodiol (11)



A una solución de bis-hidrazina **10** (18,64 g, 41 mmoles) en metanol (150 ml) le fue añadido níquel Raney (20 g, lechada al 50%). La suspensión fue cargada con hidrógeno (250 psi) (psi = libras/pulgada<sup>2</sup>) y fue calentada a 100°C por espacio de 16 h. La suspensión fue enfriada y filtrada a través de celite, y el disolvente fue retirado bajo presión reducida. Mediante cromatografía (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/metanol al 10%) fue obtenida la diamina **11** en forma de un aceite (12,49 g, 83%): RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.08 (ab, J = 8.1 Hz, Δν = 15.2 Hz, 8 H), 4.01 (s, 2 H), 2.94 (m, 2 H), 2.77 (A de ABX, J<sub>AB</sub> = 13.4 Hz, J<sub>AX</sub> = 4.6 Hz, 2 H), 2.51 (B de ABX, J<sub>AB</sub> = 13.4 Hz, J<sub>BX</sub> = 9.7 Hz, 2 H), 2.32 (s, 6 H), 1.45 (s, 6 H); IR (KBr) ν 2980, 2920, 1510 cm<sup>-1</sup>; LRMS (ESI) m/z: 369 (M+H<sup>+</sup>, 16%), 185 (M+2H<sup>+</sup>, 100%); HRMS calcd. para C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 369.2542; hallado 369.2534.

## Parte C

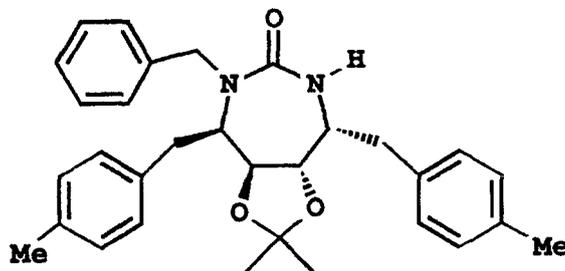
(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-hexahidro-5,6-*O*-isopropilideno-4,7-bis[(4-metilfenil) metil]-2*H*-1,3-diazapin-2-ona (**12**)

**12**

A una solución de diamina **11** (12,48 g, 33,9 mmoles) en 1,1,2,2-tetracloroetano (130 ml) le fue añadido 1,1'-carbonildiimidazol (5,67 g, 35,0 mmoles). Tras 10 min., la solución fue añadida gota a gota a lo largo de 45 min. a 1,1,2,2-tetracloroetano (600 ml) en reflujo. La solución fue enfriada, lavada con agua y con salmuera y secada ( $\text{MgSO}_4$ ). El disolvente fue retirado bajo presión reducida, y el residuo fue sometido a cromatografía (gel de sílice, hexano/acetato de etilo al 33%) seguida por recristalización (hexano/acetato de etilo), habiendo sido así obtenida la urea cíclica **12** en forma de un sólido blanco (6,18 g, 46%): pf. 228-230°C;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.12 (br s, 8 H), 4.93 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2 H), 4.25 (s, 2 H), 3.50 (m, 2 H), 3.01 (app. d,  $J = 13.2$  Hz, 2 H), 2.78 (app. t,  $J = 11.8$  Hz, 2 H), 2.33 (s, 6 H), 1.54 (s, 6 H); IR (KBr)  $\nu$  3260, 2930, 1670, 1090  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (ESI)  $m/z$ : 395 ( $\text{M}+\text{H}^+$ , 100%); HRMS calcd. para  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 395.2335; hallado 395.2333.

## Parte D

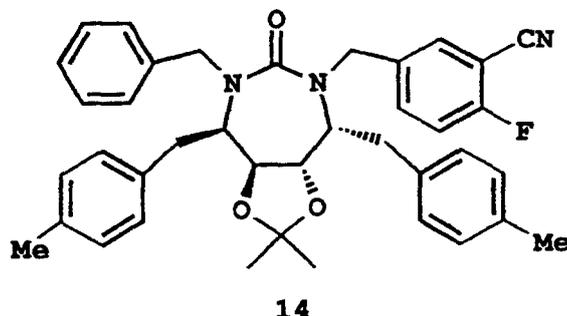
(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-hexahidro-5,6-*O*-isopropilideno-4,7-bis[(4-metilfenil)metil]-1- fenilmetil-2*H*-1,3-diazapin-2-ona (**13**)

**13**

A una solución de urea cíclica **12** (3,0 g, 7,6 mmoles) y bromuro de bencilo (1,59 g, 9,3 mmoles) en THF (300 ml) a 0°C le fue añadido gota a gota a lo largo de 30 min. *t*-butóxido de potasio (8,4 ml, 8,4 mmoles, 1,0M en THF). Se dejó que la solución se calentase hasta la temperatura ambiente, y la solución se tuvo en agitación durante la noche. La mezcla de reacción fue diluida con salmuera y fue sometida a extracción con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera y secadas ( $\text{MgSO}_4$ ). El disolvente fue retirado bajo presión reducida y el residuo fue sometido a cromatografía (gel de sílice, hexano/acetato de etilo al 25%), habiendo sido así obtenida urea cíclica **13** en forma de un vidrio (2,57 g, 70%): RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.28 (m, 3 H), 7.15 (m, 10 H), 5.12 (d,  $J = 14.6$  Hz, 1 H), 4.88 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1 H), 4.23 (m, 1 H), 3.75 (m, 2 H), 3.47 (m, 1 H), 3.01 (m, 3 H), 2.86 (d,  $J = 14.6$  Hz, 1 H), 2.66 (m, 1 H), 2.37 (s, 3 H), 2.34 (s, 3 H), 1.45 (s, 3 H), 1.40 (s, 3 H); IR (KBr)  $\nu$  2930, 1650, 1240, 1090  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (ESI)  $m/z$ : 485 ( $\text{M}+\text{H}^+$ , 100%); HRMS calcd. para  $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_3$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 485.2804; hallado 485.2789.

## Parte E

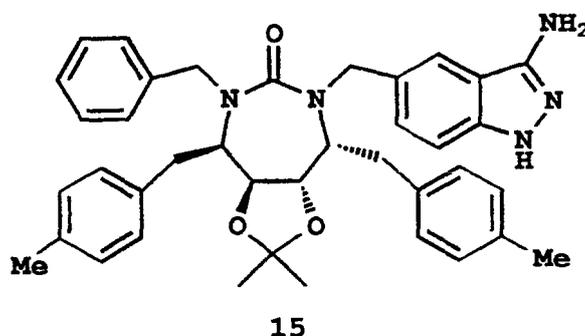
(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-hexahidro-1-[(3-ciano-4-fluorofenil) metil]-5,6-*O*-isopropilideno-4,7-bis [(4-metilfenil)metil]-3-fenilmetil-2*H*-1,3-diazapin-2-ona (**14**)



A una solución de urea cíclica **13** (2,30 g, 4,75 mmoles) y bromuro de 3-ciano-4-fluorobencilo (1,07 g, 5,0 mmoles) en THF (200 ml) a 0°C le fue añadido *t*-butoxido de potasio (4,8 ml, 4,8 mmoles, 1,0M en THF). La solución fue calentada hasta la temperatura ambiente y agitada durante la noche. La mezcla de reacción fue diluida con salmuera y fue sometida a extracción con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera y secadas (MgSO<sub>4</sub>). El disolvente fue retirado bajo presión reducida y el residuo fue sometido a cromatografía (gel de sílice, hexano/acetato de etilo al 25%), habiendo sido así obtenida urea cíclica **14** en forma de un vidrio (2,43 g, 82%): RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.33 (m, 5 H), 7.13 (d, J = 7.7 Hz, 4 H), 6.95 (m, 7 H), 4.89 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 4.46 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 3.97 (m, 1 H), 3.78 (m, 3 H), 3.65 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 3.07 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 2.83 (m, 4 H), 2.36 (s, 3 H), 2.34 (s, 3 H), 1.44 (s, 3 H), 1.38 (s, 3 H); IR (KBr) ν 2980, 2930, 2240, 1630, 1230 cm<sup>-1</sup>; CIMS (NH<sub>4</sub>) m/z: 635 (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 100%); HRMS calcd. para C<sub>39</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F (M+H<sup>+</sup>) 618.3132; hallado 618.3119.

## Parte F

(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-hexahidro-1-[5-(3-aminoindazol) metil]-5,6-*O*-isopropilideno-4,7-bis[(4-metilfenil)metil]-3-fenilmetil-2*H*-1,3-diazapin-2-ona (**15**)



A una solución de urea cíclica **14** (2,40 g, 3,89 mmoles) en *n*-butanol (40 ml) le fue añadido monohidrato de hidrazina (19,8 g, 395 mmoles), y la solución resultante fue tenida en reflujo durante la noche. La mezcla de reacción fue diluida con agua y fue sometida a extracción con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera y secadas (MgSO<sub>4</sub>). El disolvente fue retirado bajo presión reducida y el residuo fue sometido a cromatografía (gel de sílice, cloruro de metileno/metanol al 10%), habiendo sido así obtenido aminoindazol **15** en forma de un sólido blanco (2,34 g, 95%): pf. 120-124°C; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.25 (m, 12 H), 6.97 (t, J = 7.7 Hz, 4 H), 4.98 (dd, J = 14.3, 2.0 Hz, 2 H), 3.80 (s, 2 H), 3.76 (m, 2 H), 3.27 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 3.09 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 2.86 (m, 4 H), 2.35 (s, 6 H), 1.32 (s, 6 H); IR (KBr) ν 3310, 2930, 1630, 1430, 1230 cm<sup>-1</sup>; CIMS (NH<sub>4</sub>) m/z: 630 (M+H<sup>+</sup>, 100%); HRMS calcd. para C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup>) 630.3444; hallado 630.3428.

## Parte G

(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-hexahidro-1-[5-(3-aminoindazol)metil]-5,6-dihidroxi-Preparación de 4,7-bis[(4-metilfenil)metil]-3-fenilmetil-2*H*-1,3-diazapin-2-ona (II)

Urea cíclica **15** (1,90 g, 3,02 mmoles) fue disuelta en HCl concentrado al 10% en metanol (40 ml). Tras 2 h fue añadido Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso saturado, y la suspensión fue sometida a extracción con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera y secadas (MgSO<sub>4</sub>). El disolvente fue retirado bajo presión reducida y el

## ES 2 202 645 T3

residuo fue sometido a cromatografía (gel de sílice, cloruro de metileno/metanol al 10%), habiendo sido así obtenido el compuesto del título en forma de un sólido blanco (1,71 g, 96%): pf. 142-146°C; RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 7.37 (s, 1 H), 7.28 (m, 3 H), 7.22 (s, 2 H), 7.15 (m, 6 H), 6.94 (m, 4 H), 4.77 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 4.72 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 3.59 (m, 2 H), 3.51 (br s, 2 H), 3.11 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 2.93 (m, 5 H), 2.31 (br s, 6 H); IR (KBr) V 3330, 2920, 1610, 1470, 1230 cm<sup>-1</sup>; CIMS (NH<sub>3</sub>) m/z: 590 (M+H<sup>+</sup>, 100%); HRMS calcd. para C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (M+H<sup>+</sup>) 590.3131; hallado 590.3132; Anal. (C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>) C, H, N

### Utilidad

Los compuestos de fórmula II poseen actividad de inhibición de la proteasa del HIV y son por consiguiente útiles como agentes antivirales para el tratamiento de la infección por HIV y de las enfermedades asociadas a la misma. Los compuestos de fórmula II poseen actividad de inhibición de la proteasa del HIV y son eficaces como inhibidores del crecimiento del HIV. La capacidad de los compuestos de la presente invención para inhibir el crecimiento o la infectividad viral es demostrada en un análisis estándar del crecimiento o la infectividad viral efectuado por ejemplo usando el método de análisis que se describe más adelante.

Los compuestos de fórmula II de la presente invención son también útiles para la inhibición del HIV en una muestra *ex vivo* que contiene HIV o de la que se espera que esté expuesta al HIV. Así, los compuestos de la presente invención pueden ser usados para inhibir el HIV presente en una muestra de fluido corporal (como por ejemplo una muestra de suero o de semen) que contenga HIV o de la que se sospeche que contiene o que está expuesta al HIV.

Los compuestos que son aportados por esta invención son también útiles como compuestos patrón o de referencia destinados a ser usados en pruebas o análisis para determinar la capacidad de un agente para inhibir la replicación de clones virales y/o la proteasa del HIV, por ejemplo en un programa de investigación farmacéutica. Así, los compuestos de la presente invención pueden ser usados en calidad de compuesto de control o de referencia en tales análisis y como patrón de control de calidad. Los compuestos de la presente invención pueden preverse en un envase o conjunto comercial de materiales y utensilios para ser usados en calidad de tal compuesto patrón o de referencia.

Puesto que los compuestos de la presente invención presentan especificidad para la proteasa del HIV, los compuestos de la presente invención pueden ser también útiles como reactivos de diagnóstico en análisis de diagnóstico para la detección de proteasa del HIV. Así, la inhibición de la actividad de proteasa en un análisis (tal como los análisis aquí descritos) por parte de un compuesto de la presente invención sería indicativa de la presencia de proteasa del HIV y del virus HIV.

En el sentido en el que estas abreviaturas son utilizadas en la presente, “μg” denota microgramo, “mg” denota miligramo, “g” denota gramo, “μl” denota microlitro, “ml” denota mililitro, “l” denota litro, “nM” denota nanomolar, “μM” denota micromolar, “mM” denota milimolar, “M” denota molar y “nm” denota nanómetro. La palabra “Sigma” indica la Sigma-Aldrich Corp. de St. Louis, MO.

### 40 *Análisis del RNA del HIV*

#### *Plásmidos de DNA y transcritos de RNA in vitro*

Plásmido pDAB 72 que contenía las secuencias gag y pol de BH10 (pares de bases 113-1816) clonado en PTZ 19R fue preparado según Erickson-Viitanen et al. *AIDS Research and Human Retroviruses* **1989**, 5, 577. El plásmido fue linealizado con Bam HI antes de la generación de transcritos de RNA *in vitro* usando el conjunto de materiales y utensilios Riboprobe Gemini system II (Promega) con RNA polimerasa T7. El RNA sintetizado fue purificado mediante tratamiento con DNasa exenta de RNasa (Promega), extracción con fenol-cloroformo y precipitación en etanol. Los transcritos de RNA fueron disueltos en agua y almacenados a -70°C. la concentración de RNA fue determinada a partir de la A<sub>260</sub>.

#### *Sondas*

Las sondas de captura biotiniladas fueron purificadas por HPLC (HPLC = Cromatografía de Líquidos de Gran Precisión) tras síntesis en un sintetizador de DNA de Applied Biosystems (Foster City, CA) mediante adición de biotina al extremo terminal de lado 5' del oligonucleótido, usando el reactivo de biotina-fosforamídita de Cocuzza, *Tet. Lett.* **1989**, 30, 6287. La sonda de captura biotinilada para gag (5'-biotina-CTAGCTCCCTGCTTGCCCATACTA 3') era complementaria a los nucleótidos 889-912 de HXB2 y la sonda de captura biotinilada para pol (5'-biotina-CCC-TATCATTTTTGGTTTCCAT 3') era complementaria a los nucleótidos 2374-2395 de HXB2. Los oligonucleótidos conjugados con fosfatasa alcalina que fueron usados como sondas informadoras fueron preparados por la Syngene (San Diego, CA.). La sonda informadora para pol (5' CTGTCTTACTTTTGATAAAACCTC 3') era complementaria a los nucleótidos 2403-2425 de HXB2. La sonda informadora para gag (5' CCCAGTATTTGTCTACAGCCTTCT 3') era complementaria a los nucleótidos 950-973 de HXB2. Todas las posiciones nucleotídicas son las del Banco de Datos de Secuencias Genéticas GenBank al que se accedió por medio del paquete de soporte lógico informático Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package (Devereau *Nucleic Acids Research* **1984**, 12, 387). Las sondas informadoras fueron preparadas como soluciones concentradas 0,5μM en 2 x SSC (SSC = citrato sódico salino) (NaCl 0,3M, citrato sódico 0,03M), Tris 0,05M, pH 8,8, 1 mg/ml de BSA (BSA = albúmina de suero bovino). Las sondas de captura biotiniladas fueron preparadas como soluciones concentradas 100μM en agua.

## ES 2 202 645 T3

### *Placas de cultivo recubiertas con estreptavidina*

Las placas de cultivo recubiertas con estreptavidina fueron obtenidas de la Du Pont Biotechnology Systems (Boston, MA).

### *Células y soluciones concentradas de virus*

Las células MT-2 y MT-4 fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con un 5% de suero de ternero fetal (FCS) para las células MT-2 o con un 10% de FCS para las células MT-4, L-glutamina 2mM y 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina, todos de Gibco. La forma replicativa del HIV-1 fue propagada en células MT-4 en el mismo medio. Las soluciones concentradas de virus fueron preparadas aproximadamente 10 días después de la infección agua de las células MT-4 y fueron almacenadas en forma de partes alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los títulos infecciosos de las soluciones concentradas de HIV-1 (forma replicativa) fueron de  $1-3 \times 10^7$  PFU (unidades formadoras de placa)/ml según medición efectuada mediante análisis de placas sobre células MT-2 (véase lo indicado más adelante). Cada parte alícuota de solución concentrada de virus usada para la infección fue descongelada solamente una vez.

Para la evaluación de la eficacia antiviral, las células a infectar fueron subcultivadas un día antes de la infección. En el día de la infección, las células fueron puestas nuevamente en suspensión a razón de  $5 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI 1640 con un 5% de FCS para las infecciones masivas o a razón de  $2 \times 10^6$ /ml en medio de Eagles modificado de Dulbecco con un 5% de FCS para la infección en placas de cultivo de microtitulación. Fue añadido el virus, y se continuó el cultivo por espacio de 3 días a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### *Análisis del RNA del HIV*

Lisados celulares o RNA purificado en GED 3M o 5M fueron mezclados con GED 5M y sonda de captura hasta una concentración final de isotiocianato de guanidinio de 3M y una concentración final de oligonucleótido de biotina de 30nM. La hibridación fue llevada a cabo en placas de cultivo de tejido de 96 cavidades de fondo en U estancueizadas (Nunc o Costar) por espacio de 16-20 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las soluciones para las reacciones de hibridación de RNA fueron diluidas tres veces con agua desionizada hasta una concentración final de isotiocianato de guanidinio de 1M, y fueron transferidas partes alícuotas (de 150  $\mu\text{l}$ ) a cavidades de placas de cultivo de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Se dejó que tuviese lugar por espacio de 2 horas a temperatura ambiente la fijación de la sonda de captura y del híbrido de RNA-sonda de captura a la estreptavidina inmovilizada, después de lo cual las placas de cultivo fueron lavadas 6 veces con tampón de lavado de placas de cultivo para ELISA de DuPont (salina tamponada con fosfato (PBS), Tween 20 al 0,05%). Una segunda hibridación de sonda informadora al complejo inmovilizado de sonda de captura y RNA objetivo hibridado fue llevada a cabo en la cavidad recubierta con estreptavidina lavada mediante la adición de 120  $\mu\text{l}$  de una mezcla de hibridación que contenía 4 X SSC, Triton al 0,66% X 100, formamida desionizada al 6,66%, 1 mg/ml de BSA y sonda informadora 5nM. Tras hibridación por espacio de una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , la placa de cultivo fue lavada de nuevo 6 veces. La actividad de fosfatasa alcalina inmovilizada fue detectada mediante adición de 100  $\mu\text{l}$  de fosfato de 4-metilumbeliferilo 0,2mM (MUBP, JBL Scientific) en tampón  $\delta$  (dietanolamina 2,5M pH 8,9 (JBL Scientific),  $\text{MgCl}_2$  10mM, dihidrato de acetato de zinc 5mM y ácido *N*-hidroxietiltilendiaminatriacético 5mM). Las placas de cultivo fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ . La fluorescencia a 450 nm fue medida usando un fluorómetro para placas de cultivo de microtitulación (Dynateck) con excitación a 365 nm.

### *Evaluación de los compuestos en células MT-2 infectadas por HIV-1 basada en placas de cultivo de microtitulación*

Los compuestos a evaluar fueron disueltos en DMSO (DMSO = sulfóxido de dimetilo) y fueron diluidos en medio de cultivo hasta dos veces la concentración más alta a analizar y una concentración máxima de DMSO de un 2%. Fueron efectuadas directamente en placas de cultivo de microtitulación de fondo en U (Nunc) adicionales diluciones seriales triples del compuesto en medio de cultivo. Tras la dilución del compuesto, fueron añadidas las células MT-2 (50  $\mu\text{l}$ ) hasta una concentración final de  $5 \times 10^5$  por ml ( $1 \times 10^5$  por cavidad). Las células fueron incubadas con los compuestos por espacio de 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en una incubadora en  $\text{CO}_2$ . Para la evaluación de la potencia antiviral, fue añadida a las cavidades de cultivo que contenían las células y las diluciones de los compuestos de ensayo una apropiada dilución de solución concentrada de virus HIV-1 (forma replicativa) (50  $\mu\text{l}$ ). El volumen final en cada cavidad era de 200  $\mu\text{l}$ . Se dejaron sin infectar ocho cavidades por placa de cultivo, siendo añadidos 50  $\mu\text{l}$  de medio en lugar del virus, mientras que ocho cavidades fueron infectadas en ausencia de compuesto antiviral alguno. Para la evaluación de la toxicidad de los compuestos, fueron cultivadas placas de cultivo paralelas sin infección por virus.

Tras 3 días de cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$  en una cámara humidificada dentro de una incubadora en  $\text{CO}_2$ , fue retirado de las placas de cultivo infectadas con HIV todo menos 25  $\mu\text{l}$  de medio/cavidad. Treinta y siete  $\mu\text{l}$  de GED 5M que contenían sonda de captura biotinilada fueron añadidos a las células y al medio restante sedimentados en cada cavidad hasta una concentración final de GED 3M y sonda de captura 30nM. La hibridación de la sonda de captura al RNA del HIV en el lisado celular fue llevada a cabo en la misma cavidad de placa de cultivo de microtitulación que había sido usada para el cultivo del virus a base de sellar la placa de cultivo con un sellador de placas de cultivo (Costar) y efectuando incubación por espacio de 16-20 horas en una incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Fue entonces añadida agua destilada a cada cavidad para diluir la mezcla de la reacción de hibridación tres veces, y 150  $\mu\text{l}$  de esta mezcla diluida fueron transferidos a una placa de cultivo de microtitulación recubierta con estreptavidina. El RNA del HIV fue cuantificado como se ha descrito anteriormente. Se hizo en cada placa de cultivo de microtitulación una curva patrón preparada a

## ES 2 202 645 T3

base de añadir cantidades conocidas de transcrito de RNA *in vitro* de pDAB 72 a cavidades que contenían células no infectadas lisadas a fin de determinar la cantidad de RNA viral hecha durante la infección.

A fin de estandarizar el inoculo viral usado en la evaluación de los compuestos con respecto a la actividad antiviral, fueron seleccionadas diluciones de virus que redundaban en un valor IC<sub>90</sub> (la concentración de compuesto requerida para reducir en un 90% el nivel de RNA de HIV) para didesoxicitidina (ddC) de 0,2 µg/ml. Cuando se seguía este procedimiento, usando varias soluciones concentradas de HIV-1 (forma replicativa) eran reproducibles los valores IC<sub>90</sub> de otros compuestos antivirales tanto más como menos potentes que la ddC. Esta concentración de virus correspondía a ~3 x 10<sup>5</sup> PFU (según medición efectuada mediante análisis en placa de cultivo sobre células MT-2) por cavidad de análisis y producía típicamente poco más o menos un 75% del máximo nivel de RNA viral que puede ser alcanzado en todo inoculo viral. Para el análisis del RNA de HIV, los valores IC<sub>90</sub> fueron determinados a partir de la reducción porcentual de la señal neta (la señal de las muestras de células infectadas menos la señal de las muestras de células no infectadas) en el análisis del RNA con respecto a la señal neta de las células no tratadas infectadas en la misma placa de cultivo (promedio de ocho cavidades). La validez de los ensayos de análisis del RNA y de la infección individuales fue juzgada según tres criterios. Se requería que la infección por los virus redundase en una señal del análisis del RNA que fuese igual a o mayor que la señal generada a base de 2 ng de transcrito de RNA *in vitro* de pDAB 72. El IC<sub>90</sub> para DDC, determinado en cada ciclo de análisis, debe ser de entre 0,1 y 0,3 µl/ml. Finalmente, el nivel de plató de RNA viral producido por un inhibidor de proteasa eficaz deberá ser de menos del 10% del nivel que es alcanzado en una infección no inhibida. Se consideraba que un compuesto era activo si su IC<sub>90</sub> resultaba ser inferior a 1µM.

Para las pruebas de la potencia antiviral, a continuación de la adición inicial de 2X solución concentrada de compuesto a una sola hilera de cavidades todas las manipulaciones en las placas de cultivo de microtitulación fueron llevadas a cabo usando una ProPette de Perkin Elmer/Cetus.

### 25 *Dosificación y Formulación*

Los compuestos antivirales de esta invención pueden ser administrados como tratamiento para infecciones virales por cualesquiera medios que produzcan el contacto del agente activo con el sitio de acción del agente, es decir la proteasa viral, en el cuerpo de un mamífero. Dichos compuestos antivirales pueden ser administrados por cualesquiera medios convencionales de los que están disponibles para ser usados en conjunción con productos farmacéuticos, ya sea como agentes terapéuticos individuales o bien en una combinación de agentes terapéuticos. Dichos compuestos antivirales pueden ser administrados en solitario, pero son preferiblemente administrados con un vehículo farmacéutico que es seleccionado sobre la base de la ruta de administración elegida y de la práctica farmacéutica estándar.

Naturalmente, la dosificación administrada variará en dependencia de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente de que se trate y su modo y ruta de administración; la edad, la salud y el peso del receptor; la naturaleza e importancia de los síntomas; la clase de tratamiento concurrente; la frecuencia de tratamiento; y el efecto deseado. Puede preverse que una dosificación diaria de ingrediente activo sea de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 miligramos por kilogramo de peso corporal, siendo la dosis preferida de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 mg/kg.

Las formas de dosificación de las composiciones que son adecuadas para la administración contienen de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg de ingrediente activo por unidad. En estas composiciones el ingrediente activo estará de ordinario presente en una cantidad de aproximadamente un 0,5-95% en peso sobre la base del peso total de la composición. El ingrediente activo puede ser administrado oralmente en formas de dosificación sólidas tales como cápsulas, tabletas y polvos, o en formas de dosificación líquidas tales como elixires, jarabes y suspensiones. El ingrediente activo puede ser también administrado por vía parenteral, en formas de dosificación líquidas estériles.

Las cápsulas de gelatina contienen el ingrediente activo y vehículos en polvo tales como lactosa, almidón, derivados celulósicos, estearato de magnesio, ácido esteárico y vehículos similares. Pueden usarse diluyentes similares para hacer tabletas comprimidas. Tanto las tabletas como las cápsulas pueden ser fabricadas como productos de liberación sostenida para permitir la liberación continua de la medicación a lo largo de un período de horas. Las tabletas comprimidas pueden estar recubiertas con azúcar o pueden tener un recubrimiento pelicular para enmascarar todo sabor desagradable y proteger la tableta de la atmósfera, o pueden tener un recubrimiento entérico para experimentar una desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorante y saborizante para incrementar la aceptación por parte de los pacientes.

Son en general vehículos adecuados para las soluciones parenterales el agua, un aceite adecuado, la solución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y soluciones de azúcares afines y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles. Las soluciones para administración parenteral contienen preferiblemente una sal soluble en agua del ingrediente activo, adecuados agentes estabilizadores y sustancias tampón, de ser necesarias. Son adecuados agentes estabilizadores agentes antioxidantes tales como bisulfito sódico, sulfito sódico o ácido ascórbico, ya sea en solitario o en combinación. Son también usados el ácido cítrico y sus sales, y etilendiaminotetraacetato sódico. Además, las soluciones parenterales pueden contener preservativos tales como cloruro de benzalconio, parahidroxibenzoato de metilo o de propilo y clorobutanol. Los vehículos farmacéuticos adecuados están descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*, que es un texto de referencia estándar en este campo.

## ES 2 202 645 T3

Las formas de dosificación farmacéutica que son útiles para la administración de los compuestos de esta invención pueden ser ilustradas de la manera siguiente:

### *Cápsulas*

5 Puede prepararse un gran número de cápsulas monodosis llenando cápsulas estándar de gelatina dura de dos componentes cada una con 100 mg de ingrediente activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 6 mg de estearato de magnesio.

### *Cápsulas de gelatina blanda*

10 Una mezcla de ingrediente activo en un agente digestible tal como aceite de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva puede ser preparada e inyectada por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina para formar cápsulas de gelatina blanda que contengan 100 mg del ingrediente activo. Las cápsulas deberán ser entonces lavadas y secadas.

### *Tabletas*

20 Puede prepararse un gran número de tabletas mediante procedimientos convencionales de forma tal que la unidad de dosificación sea de 100 mg de ingrediente activo, 0,2 mg de dióxido de silicio coloidal, 5 miligramos de estearato de magnesio, 275 mg de celulosa microcristalina, 11 mg de almidón y 98,8 miligramos de lactosa. Pueden ser aplicados recubrimientos apropiados para incrementar la apetibilidad o retardar la absorción.

### *Suspensión*

25 Puede ser preparada una suspensión acuosa para administración oral de forma tal que cada 5 ml contengan 25 mg de ingrediente activo finamente dividido, 200 mg de carboximetilcelulosa sódica, 5 mg de benzoato sódico, 1,0 g de solución de sorbitol, U.S.P., y 0,025 mg de vainillina.

### *Inyectable*

30 Puede prepararse una composición parenteral adecuada para administración mediante inyección a base de agitar un 1,5% en peso de ingrediente activo en un 10% volumétrico de propilenglicol y agua. La solución es esterilizada mediante técnicas comúnmente utilizadas.

### *Combinación de componentes (a) y (b)*

35 Cada componente consistente en un agente terapéutico de esta invención puede estar independientemente en cualquier forma de dosificación tal como las anteriormente descritas, y puede ser también administrado de varias maneras, como se ha descrito anteriormente. En la descripción siguiente debe entenderse que el componente (b) representa uno o varios agentes de los descritos anteriormente. Así, si los componentes (a) y (b) van a ser tratados igual o independientemente, cada agente del componente (b) puede ser también tratado igual o independientemente.

45 Los componentes (a) y (b) de la presente invención pueden ser formulados juntos, en una sola unidad de dosificación, (es decir, combinados juntamente en una cápsula, una tableta, un polvo, un líquido, etc.) como un producto realizado como combinación terapéutica. Cuando los componentes (a) y (b) no sean formulados juntos en una sola unidad de dosificación, el componente (a) puede ser administrado al mismo tiempo que el componente (b) o en cualquier orden; y por ejemplo el componente (a) de esta invención puede ser administrado en primer lugar, siendo a continuación efectuada la administración del componente (b), o bien dichos componentes pueden ser administrados en orden inverso. Si el componente (b) contiene más de un agente, como p. ej. un inhibidor de transcriptasa inversa y un inhibidor de proteasa, estos agentes pueden ser administrados juntos o en cualquier orden. Cuando los componentes no sean administrados al mismo tiempo, preferiblemente la administración de los componentes (a) y (b) tendrá lugar con una distancia en el tiempo de menos de aproximadamente una hora. Preferiblemente, la ruta de administración del componente (a) y (b) es la oral. En el sentido en el que se las utiliza en la presente, las expresiones "agente oral", "inhibidor oral", "compuesto oral" o expresiones similares denotan compuestos que pueden ser administrados oralmente. A pesar de que es preferible que el componente (a) y el componente (b) sean ambos administrados por la misma ruta (es decir siendo por ejemplo administrados ambos oralmente) o en la misma forma de dosificación, si se desea cada uno de dichos componentes puede ser administrado por una ruta distinta (es decir que por ejemplo un componente del producto realizado como combinación terapéutica puede ser administrado oralmente, y el otro componente puede ser administrado por vía intravenosa) o en una forma de dosificación distinta.

60 Como comprenderá un médico experto en la materia, la dosificación de la terapia realizada con una combinación terapéutica de la invención puede variar en dependencia de varios factores tales como las características farmacodinámicas del agente en cuestión y su modo y ruta de administración, la edad, salud y peso del receptor, la naturaleza e importancia de los síntomas, la clase de tratamiento concurrente, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado, como se ha descrito anteriormente.

## ES 2 202 645 T3

La correcta dosificación de los componentes (a) y (b) de la presente invención podrá ser determinada fácilmente por un médico experto en la materia, sobre la base de la presente descripción. A título de guía general, típicamente una dosificación diaria puede ser de aproximadamente 1000 miligramos a aproximadamente 1,5 gramos de cada componente. Si el componente (b) representa más de un compuesto, una dosificación diaria podrá ser entonces típicamente de poco más o menos 100 miligramos a poco más o menos 1,5 gramos de cada agente del componente (b). A título de orientación general, cuando los compuestos del componente (a) y del componente (b) sean administrados en combinación, la cantidad de dosificación de cada componente puede ser reducida en aproximadamente un 70-80% con respecto a la dosificación habitual del componente cuando el mismo es administrado en solitario como único agente para el tratamiento de la infección por HIV.

Los productos realizados como combinaciones terapéuticas de esta invención pueden ser formulados de forma tal que, a pesar de que los ingredientes activos sean combinados en una sola unidad de dosificación, sea minimizado el contacto físico entre los ingredientes activos. A fin de minimizar el contacto, por ejemplo cuando el producto sea administrado oralmente un ingrediente activo puede ser provisto de un recubrimiento entérico. Aplicando un recubrimiento entérico a uno de los ingredientes activos, no tan sólo es posible minimizar el contacto entre los ingredientes activos combinados, sino que es además posible controlar la liberación de uno de estos componentes en el tracto gastrointestinal para que uno de estos componentes no sea liberado en el estómago, sino que sea liberado en los intestinos.

Otra realización de esta invención en la que se desea la administración oral prevé un producto realizado como combinación terapéutica en el cual uno de los ingredientes activos es recubierto con un material de liberación sostenida que lleva a cabo una liberación sostenida a lo largo de todo el tracto gastrointestinal y sirve también para minimizar el contacto físico entre los ingredientes activos combinados. Además, el componente que es objeto de liberación sostenida puede ser adicionalmente provisto de un recubrimiento entérico para que la liberación de este componente tenga lugar tan sólo en el intestino. Otra solución adicional supondría la formulación de un producto realizado como combinación terapéutica en el cual un componente es recubierto con un polímero de liberación sostenida y/o entérica y el otro componente es también recubierto con un polímero tal como una calidad de baja viscosidad de hidroxipropilmetilcelulosa u otros materiales apropiados conocidos en la técnica, a fin de separar adicionalmente los componentes activos. El recubrimiento de polímero sirve para formar una barrera adicional a la interacción con el otro componente. En cada formulación en la que se impida el contacto entre los componentes (a) y (b) por medio de un recubrimiento o de algún otro material, puede impedirse también el contacto entre los agentes individuales del componente (b).

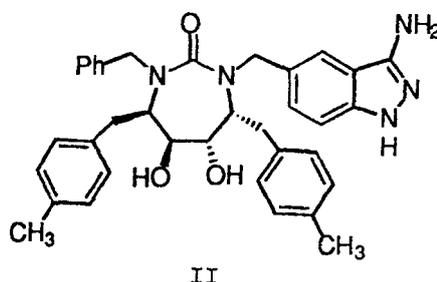
Las formas de dosificación de los productos realizados como combinaciones terapéuticas de la presente invención en las que un ingrediente activo es dotado de un recubrimiento entérico pueden estar en forma de tabletas de forma tal que el componente dotado del recubrimiento entérico y el otro ingrediente activo sean mezclados uno con otro y sean entonces comprimidos para formar una tableta, o bien de forma tal que el componente dotado del recubrimiento entérico sea comprimido formando una capa de la tableta y el otro ingrediente activo sea comprimido formando una capa adicional. Opcionalmente, a fin de separar adicionalmente las dos capas, pueden estar presentes una o varias capas de placebo de forma tal que la capa de placebo esté entre las capas de los ingredientes activos. Además, las formas de dosificación de la presente invención pueden estar en forma de cápsulas en las que un ingrediente activo es comprimido formando una tableta o bien en forma de una pluralidad de microtabletas, partículas, gránulos o micropíldoras que son entonces provistas o provistos de un recubrimiento entérico. Estos gránulos, microtabletas, partículas o micropíldoras provistos de un recubrimiento entérico son entonces puestos en una cápsula o comprimidos formando una cápsula junto con una granulación del otro ingrediente activo.

Sobre la base de la presente descripción resultarán del todo obvias para los expertos en la materia estas y otras maneras de minimizar el contacto entre los componentes de los productos realizados como combinaciones terapéuticas de la presente invención, tanto si son administrados en una sola forma de dosificación como si son administrados en formas separadas pero al mismo tiempo o en concurrencia y de la misma manera.

Están también dentro del ámbito de la presente invención los conjuntos farmacéuticos de materiales y utensilios que son útiles para el tratamiento de la infección por HIV y comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de componente (a) y uno o varios compuestos de componente (b) en uno o varios envases estériles. La esterilización del envase puede ser efectuada usando la metodología de esterilización convencional que es perfectamente conocida para los expertos en la materia. El componente (a) y el componente (b) pueden estar en el mismo envase estéril o en envases estériles independientes. Los envases estériles de los materiales pueden comprender envases independientes o uno o varios envases pluripartitos, según se desee. El componente (a) y el componente (b) pueden estar presentados por separado, o bien pueden estar combinados físicamente constituyendo una sola forma o unidad de dosificación como se ha descrito anteriormente. Si se desea, tales conjuntos de materiales y utensilios pueden incluir además uno o varios de diversos componentes de los conjuntos farmacéuticos de materiales y utensilios convencionales, tales como, por ejemplo, uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables, viales adicionales para mezclar los componentes, etc., como resultará del todo obvio para los expertos en la materia. Pueden estar asimismo incluidas en el conjunto de materiales y utensilios instrucciones realizadas ya sea en forma de insertos o bien como etiquetas indicando las cantidades de los componentes a administrar, directrices para la administración y/o directrices para mezclar los componentes.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula II:



donde cada R es OH o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

o compuesto de fórmula II en el que ambos grupos R tomados juntamente forman una mitad seleccionada de entre los miembros del grupo que consta de -O-, -OCH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>O-, -OC(=O)O-, -OCH<sub>2</sub>O-, -OC(=S)O-, -OC(=O)C(=O)O-, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O-, -OC((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)(CH<sub>3</sub>)O-, -OC(OCH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)O- u -OS(=O)O-.

2. Composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

3. Compuesto de la reivindicación 1 destinado a ser usado para tratar la infección por HIV.

4. Combinación de un compuesto de la reivindicación 1 y al menos un compuesto seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de inhibidores de transcriptasa inversa del HIV e inhibidores de proteasa del HIV, destinada a ser usada para tratar la infección por HIV.

5. Combinación según la reivindicación 4, en la que el inhibidor de transcriptasa inversa es un inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa.

6. Combinación según la reivindicación 5, en la que el inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de AZT, 3TC, ddI, ddC y d4T y el inhibidor de proteasa es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de saquinavir, ritonavir, indinavir, VX-478, nelfinavir, KNI-272, CGP-61755 y U-103017.

7. Combinación según la reivindicación 6, en la que el inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de AZT y 3TC y el inhibidor de proteasa es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de saquinavir, ritonavir e indinavir.

8. Combinación según la reivindicación 7, en la que el inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa es AZT.

9. Combinación según la reivindicación 7, en la que el inhibidor de proteasa es indinavir.

10. Conjunto farmacéutico de materiales y utensilios que es útil para el tratamiento de la infección por HIV y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de:

(a) un compuesto de la reivindicación 1; y

(b) al menos un compuesto seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de inhibidores de transcriptasa inversa del HIV e inhibidores de proteasa de HIV, en uno o varios envases estériles.

11. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 en forma de la sal aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por HIV.

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.